

El epitelio pigmentado, un aliado en la sombra contra la degeneración retiniana.



Juan Ramón Martínez-Morales. Centro Andaluz de Biología del Desarrollo (CSIC/UPO/JA). Sevilla.

Origen evolutivo de la asociación entre fotorreceptores y células pigmentadas.

En términos evolutivos, la emergencia de la visión, entendida como la capacidad de detectar y formar imágenes, constituyó un éxito adaptativo sin precedentes en la historia de la vida. A pesar de que sólo unos pocos de entre los grupos mayores del reino animal están equipados con ojos funcionales (6 de 36 phyla reconocidos¹), el 95% de las especies vivas están incluidas dentro de estos pocos grupos (Land and Nilsson, 2002). En otras palabras, los 30 grupos animales restantes que carecen de

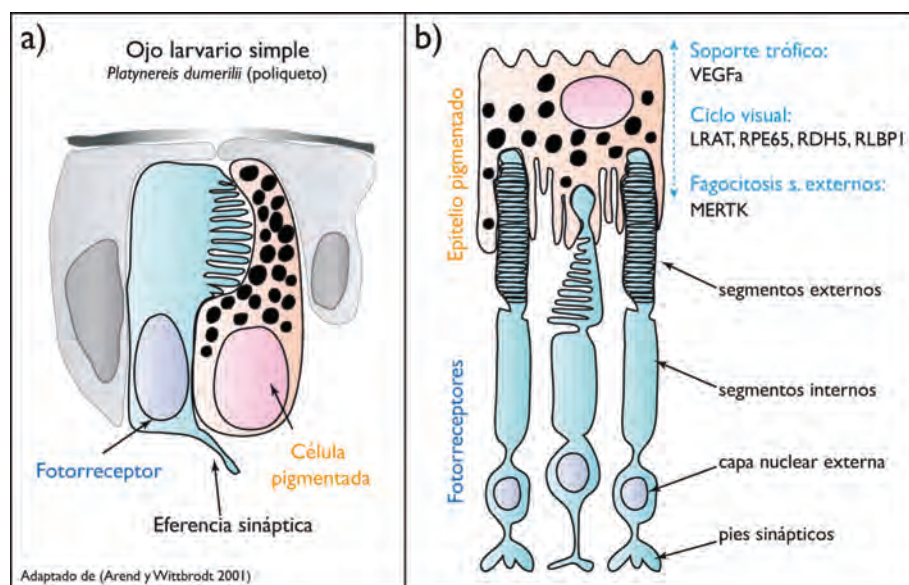
visión espacial² han radiado considerablemente menos, dando lugar a muchas menos especies y ocupando nichos ecológicos más especializados. La información visual es tan relevante a nivel adaptativo, que su detección compensa el mantenimiento de unos órganos energéticamente tan caros como son los ojos. Así es, el consumo de oxígeno del ojo humano por gramo de tejido es incluso mayor que el del exigente cerebro. Pero, ¿a que se debe esta elevada tasa metabólica?. La detección de la luz y su transformación en una señal eléctrica interpretable por el cerebro, es un proceso complejo cuyo mantenimiento requiere un gasto considerable de ATP, la moneda de cambio energético de las células. Tanto la cascada proteica de foto-transducción acoplada a las opsinas (los pigmentos visuales fotorreceptores), como los procesos de transporte intracelular y síntesis de proteínas y neurotransmisores consumen energía. La gran mayoría del gasto energético se deriva sin embargo del mantenimiento del potencial de reposo en las membranas eléctricamente excitables de los fotorreceptores (Wong-Riley, 2010).

En todos los ojos del reino animal, tanto en vertebrados como en invertebrados, los fotorreceptores aparecen asociados a células pigmentadas que contienen gránulos oscuros especializados de melanina, homocromos o pteridinas. Esto ocurre incluso en las estructuras fotorreceptivas más simples. Así, en los ojos larvarios de algunos gusanos (nematodos o planarias), la estructura visual queda reducida a su unidad mínima, la compuesta de un único fotorreceptor y una sola célula pigmentada (Arendt and Wittbrodt, 2001)(Figura 1a). Muy

¹ Estos 36 grupos mayores se originaron durante la explosión del Cámbrico hace 450 millones de años. Los seis grupos que poseen ojos funcionales son: cordados, equinodermos, artrópodos, moluscos, anélidos y cnidarios.

² Algunos de estos grupos poseen órganos fotorreceptivos rudimentarios que aunque no permiten la visión espacial si posibilitan la detección de la intensidad de la luz.

a menudo, tanto en los fotorreceptores rabdoméricos característicos de los invertebrados como en los ciliares de los vertebrados, los repliegues membranosos en los que se concentra el fotopigmento (opsina) aparecen embebidos en las células pigmentadas (Figura 1b). Esta íntima asociación morfológica se relaciona con las funciones de ambos tipos celulares y la propia fisiología de la visión, como veremos a continuación.



Significado fisiológico de la asociación fotorreceptor/célula pigmentada.

El pigmento visual, la rodopsina, surge de la combinación de la proteína transmembrana opsina y el grupo prostético retinal. Desde un punto de vista molecular, la detección de la luz depende de la capacidad de este grupo retinal de cambiar de conformación (de 11-cis a all-trans) al absorber un fotón. Este cambio conformacional en el seno de la opsina es en último extremo el que dispara la cascada de transducción mediada por proteínas G que conduce a la hiperpolarización de los fotorreceptores (o su depolarización en invertebrados). El mantenimiento de este proceso requiere de un reciclaje continuo tanto del grupo retinal, que necesita de procesamiento enzimático (ciclo visual) para recuperar su conformación cis (Goldsmith, 2013), como de las propias membranas fotosensibles, que se degradan continuamente debido al efecto foto-tóxico: la generación de

radicales libres inducida por la luz (Youssef et al., 2011).

Las células pigmentadas llevan a cabo todas estas funciones auxiliares de reciclaje que son esenciales para la visión. En vertebrados, se trata de un epitelio monocapa altamente especializado que es esencial para el correcto desarrollo y la homeostasis de la retina neural adyacente (Raymond and Jackson, 1995; Strauss, 2005). En primer lugar, el

tejido es una fuente de factores tróficos, tales como el PEDF (pigment-epithelium derived factor), una proteína implicada en la supervivencia de la retina (Barnstable and Tombran-Tink, 2004; Wang et al., 2013). Así mismo, el epitelio pigmentado cumple una función esencial en la regeneración tanto del retinal, como de los segmentos externos fotosensibles de conos y bastones. Mientras que los segmentos externos de los fotorre-

ceptores son sintetizados en su base, las regiones apicales contienen proteínas y lípidos foto-envejecidos que requieren de su reciclaje (Young and Bok, 1969). Es el balance entre la síntesis basal y la fagocitosis apical lo que mantiene la longitud de los segmentos externos constante. La fagocitosis de los segmentos externos sigue un ritmo circadiano sincronizado por la luz según el cual aproximadamente un 10% de los segmentos externos es reciclado cada día.

Papel del epitelio pigmentado en degeneración retiniana:

Como hemos visto, el proceso de fototransducción es energéticamente costoso y requiere de la regeneración constante de membranas y cromóforos. No es por tanto sorprendente que los conos y bastones de la retina sean particularmente susceptibles al envejecimiento y la degeneración, un fenómeno común a muchas retinopatías progre-

sivas y la causa más común de ceguera en adultos. La estrecha cooperación existente entre los fotorreceptores y el epitelio pigmentado explica el hecho de que los defectos genéticos del pigmentario se traduzcan a menudo en la degeneración de los fotorreceptores. De hecho, en el caso del pez-cebra, se ha comprobado que en un número considerable de mutantes con defectos en la función visual, el tejido afectado resulta ser el epitelio pigmentado (Neuhaus et al., 1999). En pacientes humanos afectados de distrofia retiniana se han descrito numerosas mutaciones causativas que afectan a genes del epitelio pigmentario (Veleri et al., 2015) (Figura 1b). Estos genes juegan papeles clave en la fisiología regenerativa de este tejido. Citamos a continuación algunos ejemplos relevantes. El receptor CD36, la quinasa MERTK y la enzima lisosomal Cathepsina-D juegan un papel esencial en la detección de fosfolípidos oxidados, la fagocitosis de las membranas fotorreceptoras y su posterior degradación, respectivamente (Caberoy et al., 2010; Rakoczy et al., 1997; Sun et al., 2006). Mutaciones en algunos de los elementos de la ruta, resultan en la acumulación de los segmentos externos dañados de los fotorreceptores y su degeneración, tal y como ocurre en los pacientes de retinosis pigmentaria afectados de mutaciones en la quinasa MERTK (Gal et al., 2000). Adicionalmente, se han detectado mutaciones en proteínas clave en el reciclaje de los pigmentos visuales.

Brevemente: la fotoexcitación de la rodopsina causa la isomerización del cromóforo 11-cis retinal que pasa a trans-retinal y es liberado de la opsina. Para cerrar el ciclo visual el trans-retinal debe ser reducido a trans-retinol en los propios fotorreceptores, transportado a las células pigmentadas (mediante la proteína IRBP), donde es incorporado (dependiente de la proteína RBP y del receptor STRA6) y transformado en cis-retinal mediante una cascada enzimática compleja (dependiente de LRAT, RPE65 y RDH5) (Bertolotti et al., 2014). Nuevamente, mutaciones en algunos de los elementos de esta ruta de reciclaje así como en genes que codifican para las enzimas y transportadores de la misma pueden resultar en degeneración retiniana y por lo tanto en retinosis pigmentaria (Ferrari et al., 2011).

Hacia nuevas terapias avanzadas:

Las enfermedades neurodegenerativas de la retina no tienen actualmente una cura definitiva. Sin embargo, la accesibilidad del ojo y su estructura relativamente sencilla en comparación con otras regiones del sistema nervioso, lo han convertido en un modelo de ensayo pionero para el desarrollo de nuevas terapias contra las enfermedades neurodegenerativas. Estas terapias emergentes, muchas aun en fase preclínica, han demostrado o bien atenuar la progresión de la enfermedad o bien restaurar la foto-sensibilidad en modelos animales. Si dejamos a un lado las aproximaciones más clásicas que incluyen el tratamiento con complementos dietéticos como las vitaminas A y E (Berson et al., 1993), o los sofisticados implantes electrónicos sub-retinianos (Chuang et al., 2014), dos tipos de terapias destacan por los avances que se han producido en los últimos años.

Terapias génicas: este tipo de estrategia se basa en el remplazo de las copias mutadas de los genes causativos con copias normales que restauren las células dañadas y por lo tanto la visión. Para la inoculación en el tejido de las copias "reparadas" se ha empleado principalmente vectores recombinantes adeno-asociados (AAV) (Sahel and Roska, 2013). Para el caso concreto de genes expresados en el epitelio pigmentario, estos vectores han demostrado rescatar con mayor o menor eficiencia mutaciones el gen RPE65 en modelos de la mutación tanto en modelos de perro y ratón (Acland et al., 2001; Pang et al., 2006)) como en humanos (Cideciyan et al., 2008). Otro ejemplo en este sentido es la restauración del gen Mertk en un modelo de ratón deficiente para el mismo (Conlon et al., 2013). Aunque las partículas adenovirales han demostrado ser vectores muy seguros para la expresión de genes tanto en fotorreceptores como en células pigmentadas existen algunas limitaciones para su uso. En primer lugar no pueden usarse como vectores de transferencia para genes mayores de 5 Kb, en segundo lugar su eficiencia se reduce cuando se trata de células maduras y por último la expresión del transgen no se produce bajo el control de sus regiones reguladoras endógenas. Estas limitaciones han podido superarse al menos en parte recientemente me-

dante el uso de los vectores AAV en combinación con la tecnología CRISPR/Cas9 que permite la inserción dirigida del transgen en su locus nativo. Empleando esta tecnología (homology independent targeted integration o HITI) se ha podido restaurar parcialmente la función visual en ratones mutantes para el gen *Mertk* con alta eficiencia (Suzuki et al., 2016).

Finalmente, otra gran promesa terapéutica es el desarrollo de estrategias de repoblación celular (Terapias celulares), basadas en la obtención tanto de células fotorreceptoras como pigmentadas a partir de células madre o pluripotentes para su implantación quirúrgica en la retina de pacientes afectados. Este tipo de aproximación terapéutica no requiere de la identificación previa de los genes mutados, y ofrece por tanto soluciones más generales ante la diversidad patofisiológica y genética que presenta la enfermedad. El epitelio pigmentario en particular, dada su arquitectura tisular relativamente simple y sus propiedades como tejido inmunológicamente privilegiado, se ha convertido en objeto de atención principal para las terapias de remplazo celular en enfermedades neurodegenerativas de la retina, algunas de ellas ya en fase clínica (Ramsden et al., 2013; Schwartz et al., 2012). En la actualidad hay dos alternativas principales para la obtención de células destinadas al trasplante paliativo: estas pueden derivar de células madre embrionarias (ESCs) o de células madre pluripotentes inducidas (iPSCs). Las últimas, iPSCs, que se derivan de células somáticas del adulto conllevan muchos menos inconvenientes desde un punto de vista ético y reducen el riesgo de rechazo post-trasplante al estar derivadas del propio paciente. Nuevamente, el reciente desarrollo de la tecnología CRISPR/Cas9, que permite el editado genético de forma mucho más eficiente, ofrece la oportunidad de "reparar" in vitro el gen mutado en células iPCs de los pacientes, antes de auto-transplantar las células corregidas (Hou et al., 2013; Li et al., 2016).

Por último, además de las aplicaciones ya mencionadas, es de destacar que las iPSCs suponen una fuente muy valiosa de modelos celulares, que pueden ser adecuados tanto para investigar las bases moleculares de las enfermedades neurodegenerativas como para llevar a cabo estudios farmacológicos (Yvon et al., 2015).

Agradecimientos: Este trabajo está financiado por las fundaciones Ramón Areces y FEDER (Federación Española de Enfermedades Raras).

Referencias:

- Acland, G.M., Aguirre, G.D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T.S., Cideciyan, A.V., Pearce-Kelling, S.E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A.M., et al. (2001). Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness. *Nat Genet* 28, 92-95.
- Arendt, D., and Wittbrodt, J. (2001). Reconstructing the eyes of Urbilateria. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences* 356, 1545-1563.
- Barnstable, C.J., and Tombran-Tink, J. (2004). Neuroprotective and antiangiogenic actions of PEDF in the eye: molecular targets and therapeutic potential. *Prog Retin Eye Res* 23, 561-577.
- Berson, E.L., Rosner, B., Sandberg, M.A., Hayes, K.C., Nicholson, B.W., Weigel-DiFranco, C., and Willett, W. (1993). A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol* 111, 761-772.
- Bertolotti, E., Neri, A., Camparini, M., Macaluso, C., and Marigo, V. (2014). Stem cells as source for retinal pigment epithelium transplantation. *Prog Retin Eye Res* 42, 130-144.
- Caberoy, N.B., Zhou, Y., and Li, W. (2010). Tubby and tubby-like protein 1 are new MerTK ligands for phagocytosis. *EMBO J* 29, 3898-3910.
- Chuang, A.T., Margo, C.E., and Greenberg, P.B. (2014). Retinal implants: a systematic review. *Br J Ophthalmol* 98, 852-856.
- Cideciyan, A.V., Aleman, T.S., Boye, S.L., Schwartz, S.B., Kaushal, S., Roman, A.J., Pang, J.J., Sumaroka, A., Windsor, E.A., Wilson, J.M., et al. (2008). Human gene therapy for RPE65 isomerase deficiency activates the retinoid cycle of vision but with slow rod kinetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15112-15117.
- Conlon, T.J., Deng, W.T., Erger, K., Cossette, T., Pang, J.J., Ryals, R., Clement, N., Cleaver, B., McDoom, I., Boye, S.E., et al. (2013). Preclinical potency and safety studies of an AAV2-mediated gene therapy vector for the treatment of MERTK associated retinitis pigmentosa. *Hum Gene Ther Clin Dev* 24, 23-28.
- Ferrari, S., Di Iorio, E., Barbaro, V., Ponzin, D., Sorrentino, F.S., and Parmeggiani, F. (2011). Retinitis pigmentosa: genes and disease mechanisms. *Curr Genomics* 12, 238-249.

- Gal, A., Li, Y., Thompson, D.A., Weir, J., Orth, U., Jacobson, S.G., Apfelstedt-Sylla, E., and Vollrath, D. (2000). Mutations in MERTK, the human orthologue of the RCS rat retinal dystrophy gene, cause retinitis pigmentosa. *Nat Genet* 26, 270-271.
- Goldsmith, T.H. (2013). Evolutionary tinkering with visual photoreception. *Vis Neurosci* 30, 21-37.
- Hou, Z., Zhang, Y., Propson, N.E., Howden, S.E., Chu, L.F., Sontheimer, E.J., and Thomson, J.A. (2013). Efficient genome engineering in human pluripotent stem cells using Cas9 from *Neisseria meningitidis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 15644-15649.
- Land, M.F., and Nilsson, D.-E. (2002). *Animal eyes* (Oxford ; New York: Oxford University Press).
- Li, Y., Chan, L., Nguyen, H.V., and Tsang, S.H. (2016). Personalized Medicine: Cell and Gene Therapy Based on Patient-Specific iPSC-Derived Retinal Pigment Epithelium Cells. *Adv Exp Med Biol* 854, 549-555.
- Neuhaus, S.C., Biehlmaier, O., Seeliger, M.W., Das, T., Kohler, K., Harris, W.A., and Baier, H. (1999). Genetic disorders of vision revealed by a behavioral screen of 400 essential loci in zebrafish. *J Neurosci* 19, 8603-8615.
- Pang, J.J., Chang, B., Kumar, A., Nusinowitz, S., Noorwez, S.M., Li, J., Rani, A., Foster, T.C., Chiodo, V.A., Doyle, T., et al. (2006). Gene therapy restores vision-dependent behavior as well as retinal structure and function in a mouse model of RPE65 Leber congenital amaurosis. *Mol Ther* 13, 565-572.
- Rakoczy, P.E., Lai, C.M., Baines, M., Di Grandi, S., Fitton, J.H., and Constable, I.J. (1997). Modulation of cathepsin D activity in retinal pigment epithelial cells. *Biochem J* 324 (Pt 3), 935-940.
- Ramsden, C.M., Powner, M.B., Carr, A.J., Smart, M.J., da Cruz, L., and Coffey, P.J. (2013). Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 140, 2576-2585.
- Raymond, S.M., and Jackson, I.J. (1995). The retinal pigmented epithelium is required for development and maintenance of the mouse neural retina. *Curr Biol* 5, 1286-1295.
- Sahel, J.A., and Roska, B. (2013). Gene therapy for blindness. *Annu Rev Neurosci* 36, 467-488.
- Schwartz, S.D., Hubschman, J.P., Heilwell, G., Franco-Cardenas, V., Pan, C.K., Ostrick, R.M., Mickunas, E., Gay, R., Klimanskaya, I., and Lanza, R. (2012). Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-720.
- Strauss, O. (2005). The retinal pigment epithelium in visual function. *Physiol Rev* 85, 845-881.
- Sun, M., Finnemann, S.C., Febbraio, M., Shan, L., Annangudi, S.P., Podrez, E.A., Hoppe, G., Darrow, R., Organisciak, D.T., Salomon, R.G., et al. (2006). Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J Biol Chem* 281, 4222-4230.
- Suzuki, K., Tsunekawa, Y., Hernandez-Benitez, R., Wu, J., Zhu, J., Kim, E.J., Hatanaka, F., Yamamoto, M., Araoka, T., Li, Z., et al. (2016). In vivo genome editing via CRISPR/Cas9 mediated homology-independent targeted integration. *Nature* 540, 144-149.
- Veleri, S., Lazar, C.H., Chang, B., Sieving, P.A., Banin, E., and Swaroop, A. (2015). Biology and therapy of inherited retinal degenerative disease: insights from mouse models. *Dis Model Mech* 8, 109-129.
- Wang, Y., Subramanian, P., Shen, D., Tuo, J., Becerra, S.P., and Chan, C.C. (2013). Pigment epithelium-derived factor reduces apoptosis and pro-inflammatory cytokine gene expression in a murine model of focal retinal degeneration. *ASN Neuro* 5, e00126.
- Wong-Riley, M.T. (2010). Energy metabolism of the visual system. *Eye Brain* 2, 99-116.
- Young, R.W., and Bok, D. (1969). Participation of the retinal pigment epithelium in the rod outer segment renewal process. *J Cell Biol* 42, 392-403.
- Youssef, P.N., Sheibani, N., and Albert, D.M. (2011). Retinal light toxicity. *Eye (Lond)* 25, 1-14.
- Yvon, C., Ramsden, C.M., Lane, A., Powner, M.B., da Cruz, L., Coffey, P.J., and Carr, A.J. (2015). Using Stem Cells to Model Diseases of the Outer Retina. *Comput Struct Biotechnol J* 13, 382-389.